HPLC-ICP-MS による水および土壌に含まれるメチル水銀の定量

アプリケーション

環境

著者

Dengyun Chen
Agilent Technologies Co., Ltd. (China)
Beijing, 100022, China

Miao Jing and Xiaoru Wang
The First Institute of Oceanography, S.O.A.
Qingdao, 266061, China

要旨

このアプリケーションノートでは、高速液体クロマトグラフ (HPLC) と組み合わせた誘導結合高周波プラズマ-質量分析計 (ICP-MS) によるメチル水銀とエチル水銀の分離および定量のメソッドについて記します。水銀は化学形態によって異なる毒性を示すため、アルキル化体から水銀元素を分離すると、試料が提起する実際のリスクに関する重要な情報が得られます。HPLC-ICP-MS メソッドは、水試料および土壌試料の分析に応用されます。このメソッドによる水中の MeHg、EtHg、および Hg^{2+} の検出下限は 10 ng/L 未満で、土壌試料から抽出した水銀元素の回収率は 80%～120% でした。

はじめに

重金属は、天然水に含まれる最も深刻な汚染物質の 1 つです。重金属類の中でもとりわけ水銀 (Hg) は、その毒性と食物連鎖による蓄積性により、特に注目されています。水銀は、すべての生態系において、空気、水、土壌、および生物組織内で微量に存在します。この微量元素は、物理的および化学的形態の違いにより、極めて様々な特性を有します [1]。水銀の毒性はその化学的形態により大きく異なることがよく知られており、様々な無機および有機の水銀化合物によりそれぞれ毒性が異なります。メチル水銀 (MeHg) は、環境や生体中で最もありふれた有機水銀で、最も毒性の高い水銀化合物です。エチル水銀 (EtHg) とフェニル水銀は、環境中に存在することはまれです。メチル水銀は無機水銀化合物の 10～100 倍以上の毒性を有し [2, 3]、人間がメチル水銀にある程度曝露すると、神経系に傷害が起こる可能性があります [4]。メチル水銀は液体への溶解度が高いため、血液脳関門を通過して、容易に細胞膜内に拡散します [5]。特に胎児は、脳の発達が速いため容易に損傷を受けます。水銀の主な被曝源は、発電などの産業活動による空気中への放出です。一般的に、水銀は環境存在下で生物活動によりメチル水銀、または少ないですがジメチル水銀にメチル化されます。魚などの海鮮品は、人間の食事におけるメチル水銀の主な被曝源であるため、妊婦に対しては特定の魚の摂食制限が勧告されています。最近では、FAO/WHO の合同食品添加物専門家会議 (JECFA) により、暫定的耐容週間摂取量 (PTWI) を週 3.3 µg/kg体重から週 1.6 µg/kg体重に引き下げることを勧告しました。表 1 をご覧ください。

Agilent Technologies

表 1　食品中メチル水銀の規制レベル (PTWI)

機関	MeHg (μg/体重 kg)
国連の食糧農業機関 (FAO)	1.6
世界保健機構 (WHO)	1.6

PTWI = 暫定的耐容週間摂取量 (Provisional Tolerable Weekly Intakes)

中国では、“都市汚水処理場汚染物排出標準 (GB 18918-2002)”におけるメチル水銀の許容レベルが“検出不能”、つまり、推奨されるメソッドの検出下限 (DL) (10 ng/L) 未満でした [6]。

環境試料内での全水銀量を定量する幾つかの方法がありますが、無機水銀と有機水銀のそれぞれを同時に定量することは困難です。これは一般的に、メチル水銀の濃度が、無機水銀よりもはるかに低いためです。水銀の定量に最もよく使用される技法は、ガスクロマトグラフ (GC) または HPLC を、水銀に選択性を持つ検出器 (蛍光検出器、炎光検出器、その他の元素選択性検出器) と組み合わせるやり方です。天然水中の水銀の濃度は低いため、非常に大量の試料水を処理する必要があります。規定の基準値が使用検出器の感度を下回ることがしばしばあるため、予め試料を濃縮する操作も必要です。

中国では、メチル水銀定量用の推奨メソッド (GB/T14204-93) により、電子捕獲検出器 (ECD) と組合せたガスクロマトグラフを使用しています。そのメソッドには、以下のような制限事項があります。

- 複雑な濃縮操作を行うにも拘らず、検出限界 (MDL) は 10 ng/L である。
- 元素に特異的なメソッドではない。
- 干渉による影響を受けるため、誤検出や低い回収率の結果となる。

この研究の目的は、図 1 に示すような HPLC と ICP-MS を組み合わせることで高感度かつ特異的なメチル水銀分析メソッドを開発することです。

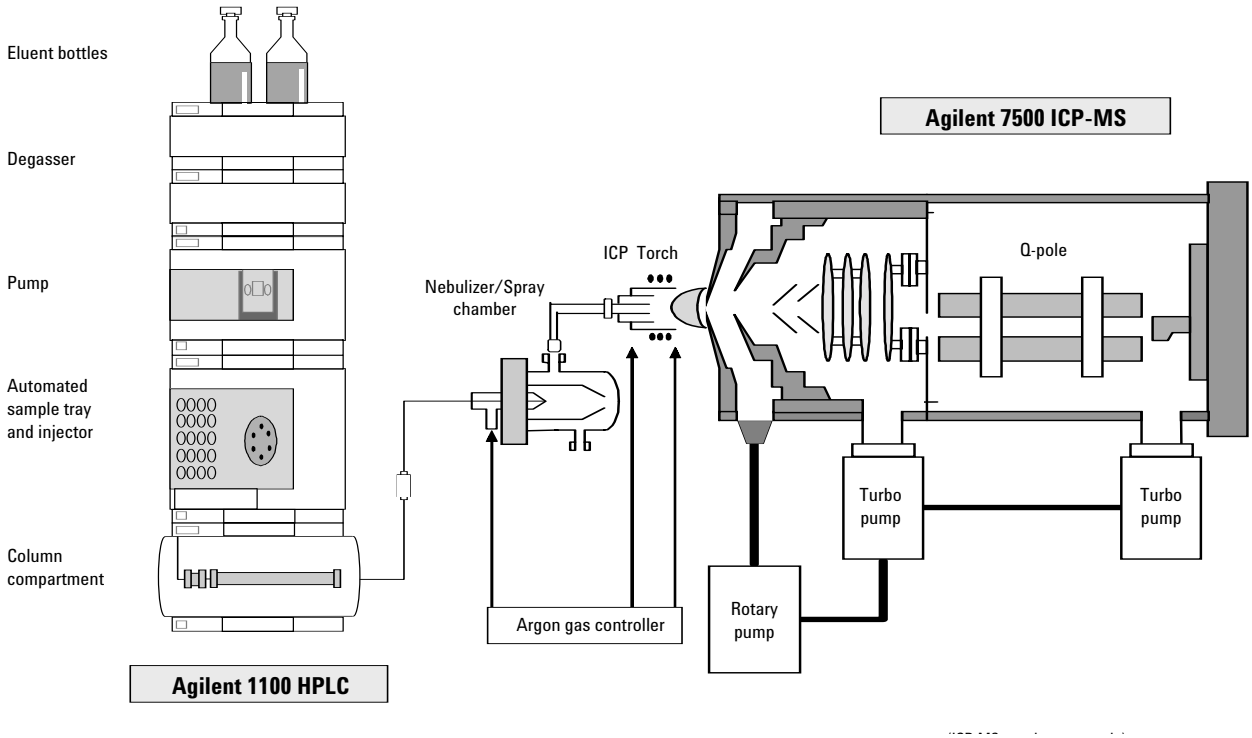

図 1　Agilent 1100 HPLC の概略図

装置

Agilent 1100 HPLC を、Agilent HPLC-ICP-MS インタフェースを介して Agilent 7500a に接続しました。サンプルループは、PEEK 製の 20 µL、100 µL、および 1000 µL を選択しました。HPLC と ICP-MS の操作パラメータを、表 2a と表 2b に示します。

表 2a HPLC の操作パラメータ

カラム	(2.1 mm 内径×50 mm×5 µm) ZORBAX Eclipse XDB-C18
移動相	0.06 mol/L 酢酸アンモニウム 5% v/v メタノール、 0.1% 2-メルカプトエタノール、pH = 6.8
流量	0.4 mL/min
注入量	100 µL

表 2b Agilent 7500a ICP-MS の操作パラメータ

RF 電源	1550 W
ネブライザ	PFA 濃縮 (100 µL/min)
スプレーチャンバ	石英、Scott 型ダブルパス、 -5 ℃ まで冷却
トーチ	石英一体 Fassel 型、 2.5 mm インジェクタ
サンプリング深	4.5 mm
キャリアガス流速	0.75 L/min
メークアップガス流速	0.40 L/min

安定度と感度

装置の安定度をモニターするため、内部標準 (ISTD) としてビスマス (Bi) 1.0 µg/L をメタノール溶離液に加えました。ビスマスシグナルを最適化することで最大限の感度が得得られるよう 7500a をチューンしました。10 時間のテスト中、ISTD の RSD は 5% 未満でした。ドリフトは極めて少なかったため、ISTD 補正の必要はありませんでした。実際の分析には、ビスマスやその他 ISTD は使用しませんでした。

HPLC カラム

最適な結果を得るため、HPLC 用メタノールを 0.4 mL/分 で 2 時間以上送液して HPLC カラム (ZORBAX Eclipse XDB-C18、2.1 mm 内径×50 mm×5 µm) を前コンディショニングしてから、同じ流量で 30 分以上溶離液でコンディショニングします。このコンディショニング作業を行わないと、システム内の汚染により無機水銀の回収率低下やピーク割れが起こります。

結果と考察

標準品試料のクロマトグラフ分離

表 2a および表 2b に示す操作条件により、純水に溶解した水銀化合物の標準品混合試料を HPLC に注入しました。全イオンクロマトグラム (TIC) の結果から、目的の水銀化合物の分離が良好に行われたことが示されました。図 2 をご覧ください。

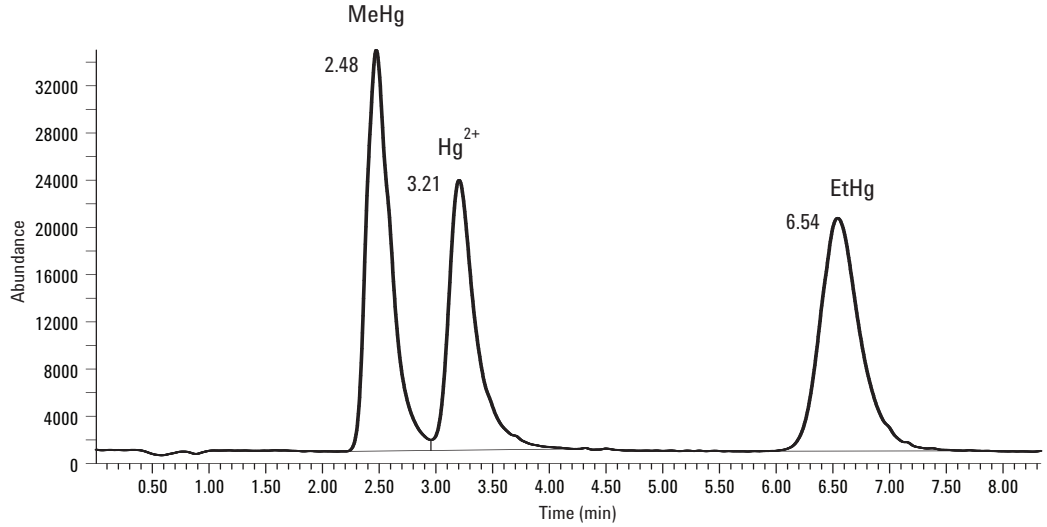

図 2　純水に溶解した 3 種類の水銀化合物標準品混合試料の HPLC-ICP-MS による全イオンクロマトグラム (TIC)。MeHg は 2.48 min、Hg^{2+} は 3.21 min、EtHg は 6.54 min にそれぞれ溶出。100 µL ループを使用。各 1.0 ppb。

表 3　HPLC-ICP-MS による水銀化合物定量の積分結果

RT (min)	化合物	水銀濃度 (µg/L)	面積
2.48	MeHg	1.0	5.09E+06
3.21	Hg2+	0.8	3.87E+06
6.54	EtHg	1.0	4.91E+06

検出の有効性

3 種類の水銀化合物の濃度はそれぞれ 1.0 µg/L であるため、各水銀化合物のピーク面積は類似していました。わずかに生じた差はおそらく、標準品の純度または標準試料の調製で生じた誤差によるものです。

HPLC-ICP-MS システムの利点の 1 つとして、アルゴンプラズマにより化合物が分解され元素としてイオン化されるので、化合物種の化学構造に依存しないことがあります。この元の化学構造に対するシグナルの非依存性はつまり化合物非依存性であり、水銀元素濃度に基づいた検量線、つまり化合物に依存しないキャリブレーション (Compound Independent Calibration：CIC) を構築することができます。同定されているすべての化合物種についての定量結果は極めて正確であり、化合物が同定されていなくても (未知化合物でも） 正確な定量が可能です。

直線性

試料を 100 倍に (メチル水銀とエチル水銀は 10 ng/L に、Hg^{2+} は 8 ng/L に)希釈した場合でも、図 3 に示すように水銀化合物の定量が可能でした。また、リテンションタイム (RT) も高い安定度を保っていました。RT 1.35 min にある小さなピークは、カラム汚染によるものでした。カラムをメタノールでクリーニングすると、このピークは消えました。

図 3 のクロマトグラムでは、水銀化合物の検出限界が 10 ng/L 未満でした。より高純度の試薬を使用することで溶離液汚染の問題が解決できれば、ng/L 単位より低い検出限界が実現できると考えられます。

一連のキャリブレーション標準は、水銀化合物の混合原液 (メチル水銀とエチル水銀では 1.0 µg/L の水銀、Hg^{2+} では 0.8 µg/L の水銀をそれぞれ純水中に溶解) を希釈して 10 ng/L～100 µg/L になるよう調製しました。100 µg/L ループを使用して得た 10 ng/L データ以外はすべて、20 µg/L 注入ループを使用しました。3 つの水銀化合物が混合された、幾つかの濃度レベルの標準試料について、ピーク面積を積分しました。HPLC-ICP-MS メソッドによる水銀化合物の検量線 (表 4 と 図 4) の直線範囲は、4 桁以上でした。この範囲は想定される実試料の濃度範囲をカバーしています。そのため、このメソッドは、予め煩雑な濃縮調製をしないで、水試料を直接注入して定量する方法として適しています。

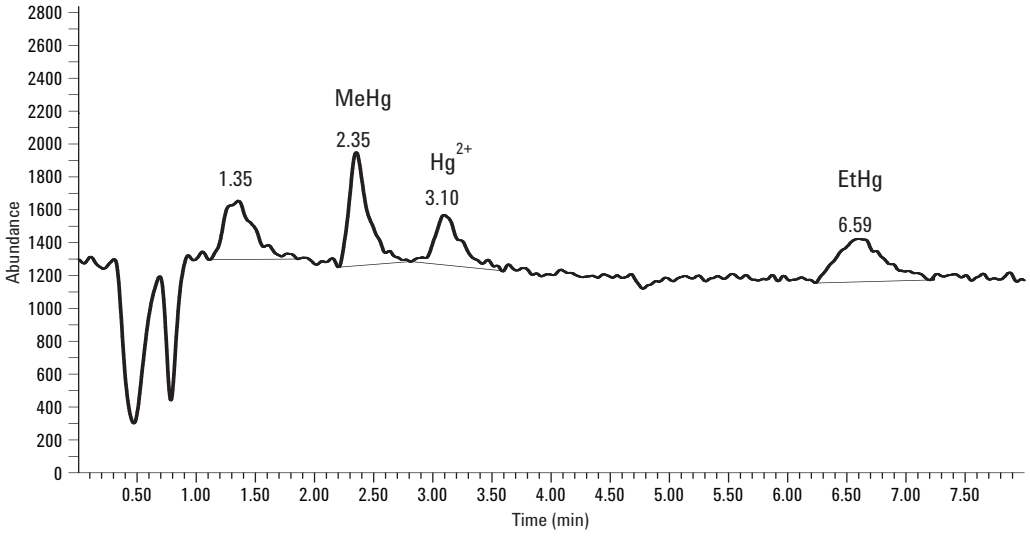

図 3　純水中 10 ng/L 水銀化合物標準品の HPLC-ICP-MS による全イオンクロマトグラム (TIC)(汚染物質が 1.35 min、MeHg は 2.35 min 、 Hg^{2+} は3.10 min、EtHg は 6.59 min にそれぞれ溶出。100 µL ループを使用)。

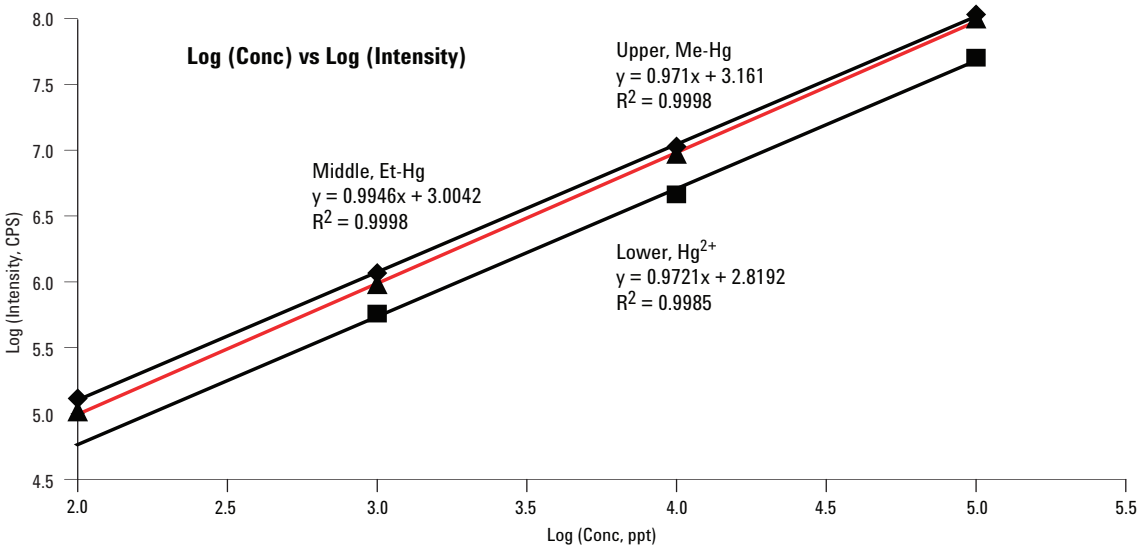

図 4　MeHg、Hg^{2+}、EtHg の検量線

表 4　HPLC-ICP-MS による水銀化合物濃度における積分ピーク面積 (Hg^{2+} 濃度は表示値の 80%)

濃度 (ng/L)	MeHg	Hg^{2+}	EtHg
100000	1.07E+08	5.03E+07	9.83E+07
10000	1.06E+07	4.61E+06	9.24E+06
1000	1.17E+06	5.72E+05	9.44E+05
100	1.30E+05	1.23E+05	1.02E+05
10	5.86E+04	3.55E+04	5.86E+04

3% NaCl 溶液に含まれる水銀化合物のクロマトグラフ分離

このメソッドによる高マトリックス試料の分析可能性をテストするため、水銀化合物の原液を 3% NaCl (w/v) 水溶液に希釈して、メチル水銀、エチル水銀、Hg^{2+} のそれぞれ 100 µg/L を含む溶液を調製しました。この溶液を 0.45 µm メンブレンで濾過した後、分析しました。試料注入には、20 µL 注入ループを使用しました。図 5 で示すように、^{202}Hg イオンクロマトグラムを、同じ濃度で純水希釈した試料のイオンクロマトグラムに重ね描きしました。また、3% NaCl 溶液の水銀化合物のピーク面積を積分して、純水溶液の標準試料と比較し 90%～110% の回収率を得ました。これにより、このメソッドは海水などの高マトリックス試料でも安定した分析ができることが示されます。

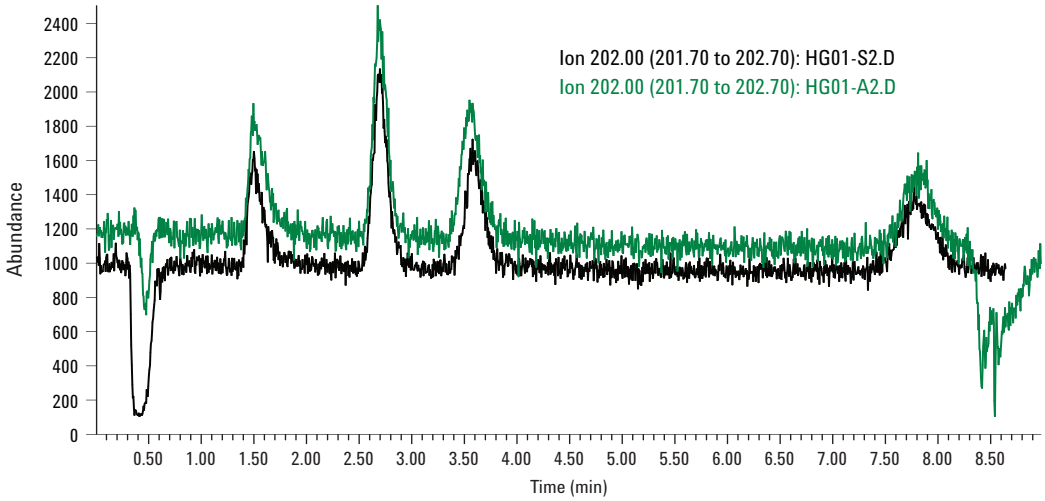

図 5　100 ng/L 水銀化合物標準品試料の HPLC-ICP-MS イオンクロマトグラム重ね描き。上は純水溶液、下は 3% NaCl (w/v) の溶液で、20 µL ループを使用。).

土壌試料でのアプリケーション

HPLC-ICP-MS メソッドを組織、土壌、底質などの固体試料に応用する場合には、試料の前処理操作が必要になります。固体試料からの水銀化合物抽出は、環境試料の場合、存在する無機水銀の量が極微量であるため、非常に重要なステップになっています。水銀化合物、特にメチル水銀は、消失したり他の水銀化合物に容易に変換されます。固体試料の溶出操作で起こりうるメチル水銀の分解を避けるために、希塩酸またはキレート試薬を使用して試料から化合物を抽出する [7] 方法を含むいくつかのメソッドが報告されています。公開されている抽出メソッドの中で、無機水銀化合物と有機水銀化合物の両方を抽出するメソッドは、時間を浪費する、労力がかかる、高純度溶媒や特別な試薬が大量に必要であるという側面があります。今回の作業では、希塩酸による簡易な抽出メソッドを用いました。土壌試料の添加回収率は、80%～120% でした。このメソッドのさらなるテストと、メチル水銀を含有する土壌リファレンスサンプルの製作を計画しています。

水銀化合物の抽出メソッド

1. 1.00 g の土壌試料を量り 20 mL プラスチック製遠心チューブに入れる。
2. 100 ng/L 水銀化合物の標準品混合溶液 の 0～90 µL を、土壌試料に添加する。よく振って混合する。
3. 7.6% HCl (w/v) 9.0 mL および 10% 2-メルカプトエタノール 1.0 mL を、各チューブに加える。抽出しやすくするため、試料を超音波バスに 30 分間入れる。
4. 粒子状物質を分離するため、試料を 5 分間 3000 rpm で遠心分離する。
5. 上澄み溶液 2.0 mL を、清浄な 50 mL ペットボトルに移す。純水を 15.0 mL 加える。
6. 10% アンモニア溶液を用いて、溶液の pH を 6.8 に調節する。
7. この溶液の重量が 20.0 g になるまで、この溶液に純水を加える。
8. この溶液を 0.45 µm メンブレンで濾過する。その後、HPLC-ICP-MS 測定を行う。

図 6 に、7.6 % HCl で土壌試料を抽出した HPLC-ICP-MS の全イオンクロマトグラム (TIC) を示します。この土壌試料には、水銀として 90 ng の標準品水銀化合物混合液が添加されています。この土壌には無機水銀が存在していたため、このクロマトグラムでの Hg^{2+} のピーク高さは、他の 2 つのピークよりも高くなっています。水銀化合物混合試料が添加されていない土壌試料の分析では、メチル水銀とエチル水銀の量は無視できるレベルでした。今回の添加回収テストの測定結果を表 5 に示します。

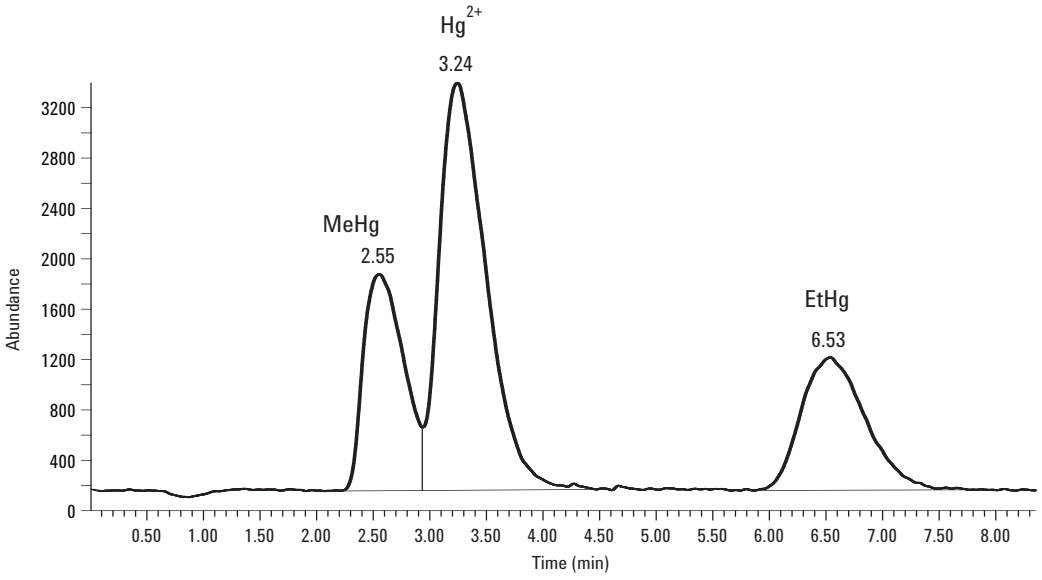

図 6　土壌試料 S-A-03 に水銀として 0.9 ng の標準品水銀化合物混合液を添加して 7.6 % HCl で抽出した試料の HPLC-ICP-MS の全イオンクロマトグラム (TIC)。MeHg は 2.55 min に、Hg^{2+} は 3.24 minに、EtHg は 6.53 min にそれぞれ溶出。100 µL ループを使用。

表 5　HPLC-ICP-MS による土壌試料に含まれる水銀化合物の添加回収率

試料	水銀化合物	回収前の値 (pg)	測定価 (pg)	回収率 (%)
S-BLK-1	MeHg	NA	2	NA
	Hg^{2+}	61	63	103
	EtHg	NA	+	NA
S-BLK-2	MeHg	NA	9	NA
	Hg^{2+}	61	65	107
	EtHg	NA	+	NA
S-A-03	MeHg	90	85	95
	Hg^{2+}	151	185	122
	EtHg	90	82	91
S-A-04	MeHg	90	80	89
	Hg^{2+}	151	181	120
	EtHg	90	75	83
S1-1	MeHg	36	34	94
	Hg^{2+}	97	88	91
	EtHg	36	28	77
S1-2	MeHg	36	37	104
	Hg^{2+}	97	105	108
	EtHg	36	35	97
S1-3	MeHg	36	41	113
	Hg^{2+}	97	98	101
	EtHg	36	43	120

NA　なし
+　測定せず

添加回収率は 80%～120% でした。これにより、土壌試料の HPLC-ICP-MS 分析用の試料調製操作の安定性が確証されました。

結論

HPLC-ICP-MS メソッドは、試料に含まれるマトリックス濃度が高い場合も含めて、水試料の分析に適しています。メチル水銀、エチル水銀、および Hg^{2+} の検出限界は 10 ng/L 未満で、現在の規制基準を満たしています。このメソッドを土壌試料に応用した場合、7.6% HCl による水銀化合物の抽出が適しており、回収率は 80%～120% でした。

参照文献

1. J. O. Nriagu (Ed.), The Biogeochemistry of Mercury in the Environment, Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam, 1979.
2. National Academy of Science, An Assessment of Mercury in the Environment, National Research Council, Washington, DC, 1978.
3. R. Hartung, B. D. Dinman (Eds.), Environmental Mercury Contamination, Ann Arbor Science, Ann Arbor, MI, 1972.
4. M. Berlin, 1986. Mercury. In: Friberg, L., Nordberg, G., Vouk, V. (Eds.), Handbook on the Toxicology of Metals. Elsevier, Amsterdam, pp. 387–444.
5. J.S. Felton, E. Kahn, B., Salick, F.C. van Natta, and M.W. Whitehouse, (1972) Heavy metal poisoning: mercury and lead. *Ann. Intern. Med.* **76**, 779–792.
6. Discharge standard of pollutants for municipal wastewater treatment plant of China, GB 18918-2002, 2002.
7. M. Jackie, A. C. Vikki, and H.E.G. Philip., *J. Anal. At. Spectrom.*, (2002), **17**, 377–381.

詳細情報

弊社製品とサービスについて更に詳しい情報をご希望のお客様は弊社Web サイト（www.agilent.com/chem/jp）をご覧ください。

お問い合わせは： 0120-477-111
横河アナリティカルシステムズ株式会社
〒192-0033 東京都八王子市高倉町9-1

www.agilent.com/chem

Agilent は、万一この資料に誤りが発見されたとしても、また、本資料の使用により付随的または間接的に損害が発生する事態が発生したとしても一切免責とさせていただきます。

本資料に記載の情報、説明、製品仕様等は予告なしに変更されることがあります。

© Agilent Technologies, Inc. 2005

Printed in Japan
September 6, 2005
5989-3572JAJP

Agilent Technologies